

**ESTROGEN RECEPTOR GENE AND ITS UTILIZATION**

Patent Number: JP2000201688  
Publication date: 2000-07-25  
Inventor(s): OSHITA HIROBUMI;; JO MEIKYOKU  
Applicant(s): SUMITOMO CHEM CO LTD  
Requested Patent: ☐ JP2000201688  
Application JP19990098787 19990406  
Priority Number(s):  
IPC Classification: C12N15/09; C07K14/72; C12N5/10; C12P21/02;  
EC Classification:  
Equivalents:

---

**Abstract**

---

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain the subject new gene for production, etc., of an estrogen receptor useful for an examination system, etc., for measuring estrogenic action and comprising an estrogen receptor gene encoding a protein having a specific amino acid sequence.

**SOLUTION:** This estrogen receptor gene encodes a protein having an amino acid sequence represented by the formula. The gene is useful for examination system, etc., for evaluating estrogen receptor activation ability of a chemical substance as a method for measuring estrogenic action of the chemical substance which is feared to get off human hormone balance and cause diseases. The gene is obtained by extracting RNA according to ordinary method from a killifish such as killifish for appreciation, reacting the RNA with a reverse transcriptase to synthesize cDNA, preparing cDNA library by using the cDNA and screening the cDNA library by hybridization method with a probe comprising a partial sequence.

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-201688

(P2000-201688A)

(43) 公開日 平成12年7月25日 (2000.7.25)

| (51) Int.Cl. <sup>7</sup>            | 識別記号  | F I           | テマコード* (参考)       |
|--------------------------------------|-------|---------------|-------------------|
| C 1 2 N 15/09                        | Z N A | C 1 2 N 15/00 | Z N A A 4 B 0 2 4 |
| C 0 7 K 14/72                        |       | C 0 7 K 14/72 | 4 B 0 6 3         |
| C 1 2 N 5/10                         |       | C 1 2 P 21/02 | C 4 B 0 6 4       |
| C 1 2 P 21/02                        |       | C 1 2 Q 1/02  | 4 B 0 6 5         |
| C 1 2 Q 1/02                         |       | C 1 2 N 5/00  | B 4 H 0 4 5       |
| 審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 23 頁) 最終頁に続く |       |               |                   |

(21) 出願番号 特願平11-98787

(22) 出願日 平成11年4月6日 (1999.4.6)

(31) 優先権主張番号 特願平10-319465

(32) 優先日 平成10年11月10日 (1998.11.10)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000002093

住友化学工業株式会社

大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

(72) 発明者 大下 博文

兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住化テ

クノサービス株式会社内

(72) 発明者 徐 明旭

兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住化テ

クノサービス株式会社内

(74) 代理人 100093285

弁理士 久保山 隆 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エストロジェンレセプター遺伝子およびその利用

(57) 【要約】

【課題】 化学物質のエストロジェン様作用を測定するための方法として、化学物質のエストロジェンレセプター活性化能を評価するための試験系を提供可能とすること。

【解決手段】 配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするエストロジェンレセプター遺伝子等。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするエストロジェンレセプター遺伝子。

【請求項2】配列番号3で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするエストロジェンレセプター遺伝子。

【請求項3】配列番号2で示される塩基配列を有するエストロジェンレセプター遺伝子。

【請求項4】配列番号1で示される塩基配列からなるエストロジェンレセプター遺伝子。

【請求項5】請求項1～4記載のエストロジェンレセプター遺伝子を含有するベクター。

【請求項6】エストロジェンレセプター遺伝子に宿主細胞で機能可能なプロモーターが機能可能な形で結合されてなる請求項5記載のベクター。

【請求項7】請求項1～4記載のエストロジェンレセプター遺伝子が宿主細胞に導入されてなる形質転換体。

【請求項8】請求項5または6記載のベクターが宿主細胞に導入されてなる形質転換体。

【請求項9】宿主細胞が動物細胞である請求項7または8記載の形質転換体。

【請求項10】請求項7～9記載の形質転換体を培養してエストロジェンレセプターを産生させ、これを回収することを特徴とするエストロジェンレセプターの製造方法。

【請求項11】配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するエストロジェンレセプター。

【請求項12】化学物質のエストロジェンレセプター活性化能を評価するためのレポーターアッセイにおいて、エストロジェン応答配列を含む転写制御領域の下流に連結されたレポーター遺伝子と請求項1～4記載のエストロジェンレセプター遺伝子とがエストロジェンレセプター非内在性宿主細胞に導入されてなる形質転換体に、化学物質を作用させることを特徴とする化学物質のエストロジェンレセプター活性化能の評価方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、エストロジェンレセプター遺伝子およびその利用に関する。

## 【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】近年、環境中の幾つかの化学物質がエストロジェン様作用を示すことが報告されている。かかる化学物質の作用はヒトのホルモンバランスを崩し、疾患の原因となることが危惧されることから、化学物質の安全性評価の一環として化学物質のエストロジェン様作用を測定する試みが行なわれている。エストロジェンの作用機序として、エストロジェンがエストロジェンの標的細胞に存在するエストロジェンレセプターに結合すると、該レセプターは活

性化され、染色体上のエストロジェン応答配列に結合して該配列の下流に在する遺伝子の発現を促進する。そこで、化学物質のエストロジェン様作用を測定するための方法として、化学物質のエストロジェンレセプター活性化能を評価するための試験系の開発が切望されている。

## 【0003】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、かかる状況の下、鋭意検討した結果、水生動物のモデル動物であるメダカのエストロジェンレセプターをコードする遺伝子を見出し、本発明に至った。即ち、本発明は、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするエストロジェンレセプター遺伝子（以下、本発明遺伝子と記す。）、配列番号3で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする該遺伝子、配列番号2で示される塩基配列を有する該遺伝子、配列番号4で示される塩基配列からなる該遺伝子、該遺伝子を含有するベクター（以下、本発明ベクターと記す。）、該遺伝子が宿主細胞に導入されてなる形質転換体（以下、本発明形質転換体と記す。）、該形質転換体を培養してエストロジェンレセプターを産生させ、これを回収することを特徴とするエストロジェンレセプターの製造方法、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するエストロジェンレセプター、化学物質のエストロジェンレセプター活性化能を評価するためのレポーターアッセイにおいて、エストロジェン応答配列を含む転写制御領域の下流に連結されたレポーター遺伝子と本発明遺伝子とがエストロジェンレセプター非内在性宿主細胞に導入されてなる形質転換体に、化学物質を作用させることを特徴とする化学物質のエストロジェンレセプター活性化能の評価方法、を提供するものである。

## 【0004】

【発明の実施の形態】以下、本発明について詳細に説明する。本発明遺伝子は、例えば、ヒメダカ等のメダカから、J.Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis著：モレキュラークローニング第2版（Molecular Cloning 2nd edition）、コールドスプリングハーバーラボラトリー（Cold Spring Harbor Laboratory）発行、1989年等に記載の遺伝子工学的方法に準じて取得することができる。具体的には、まず、ヒメダカ等のメダカからRNAを調製する。例えば、ヒメダカの内臓を塩酸グアニジンやグアニジンチオシアネート等の強力な蛋白質変性剤を含む溶液中で粉砕し、さらに該粉砕物にフェノール、クロロホルム等を加えることにより蛋白質を変性させる。変性蛋白質を遠心分離等により除去した後、回収された可溶性成分から、塩酸グアニジン・フェノール法、SDS-フェノール法、グアニジンチオシアネート・CsCl法等の方法により全RNAを抽出する。なお、これらの方法に基づいた市販のRNA調製用キットとしては、例えばISOGEN（ニッポンジーン製）がある。得られた全RNAを鋳型として使用し、該RNAにオリゴdTプラ

プライマーをアニールさせた後に逆転写酵素を作用させることにより一本鎖cDNAを合成し、次いで、該一本鎖cDNAに大腸菌RNAse Hおよび大腸菌のDNAポリメラーゼIを作用させて二本鎖のcDNAを合成する。更に該cDNAの両末端をT4 DNAポリメラーゼにより平滑化する。得られたcDNAはフェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿等の通常の方法により精製し、回収する。なお、これらの方法に基づいた市販のcDNA合成用キットとしては、例えばcDNA合成システムプラス（アマシャム社製）がある。このようにして得られたcDNAを例えば、プラスミドpUC118やファージst11などのベクターにリガーゼを用いて挿入することによりcDNAライブラリーを作製する。次に、このようにcDNAライブラリーから、例えば、配列番号2で示される塩基配列の部分塩基配列を有するDNA断片をプローブとして用いるハイブリダイゼーション法や、配列番号2で示される塩基配列の部分塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いるPCR法により、本発明遺伝子を取得することができる。また、上記のようにして調製された全RNAを鋳型に使用して逆転写反応を行なった後、得られたDNAを鋳型にしてPCRを行なうことにより（RT-PCR法）本発明遺伝子を取得することもできる。上記のPCR法またはRT-PCR法においてPCRにより本発明遺伝子を増幅する際に用いるプライマーとしては、例えば、20bpから40bp程度の長さでかつGまたはC塩基の割合が40%から70%程度の塩基配列を、配列番号2で示される塩基配列の5'末端領域および3'末端領域からそれぞれ選択し、該塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成するとよい。具体的には、例えば、フォワードプライマーの塩基配列としては5'-ATG TAC CCT GAA GAG AGC CGG G-3'や5'-AAG CTT CAT GAG TAA GAG ACA GAG C-3'があげられ、リバースプライマーの塩基配列としては5'-TCA GTC TTG AAG GGC CGG GGA G-3'があげられる。このようにしてPCRで増幅された本発明遺伝子は、例えば、J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis著；モレキュラー クローニング 第2版（Molecular Cloning 2nd edition）、コールドスプリングハーバー ラボラトリー（Cold Spring Harbor Laboratory）発行、1989年等に記載の遺伝子工学的の方法に準じてベクターにクローニングすることができる。具体的には例えば、TAクローニングキット（Invitrogen社）やpBlue-scriptII（Stratagene社）などの市販のプラスミドベクターを用いてクローニングすることができる。尚、本発明遺伝子は、配列番号2や配列番号4で示される塩基配列に基づいて、例えばホスファイトトリエステル法（Hunkapiller, M. et al., Nature, 310, 105, 1984）等の通常の方法に準じて、核酸の化学合成を行うことにより調製することもできる。得られた本発明遺伝子の塩基配列は、Maxam-Gilbert法（例えば、Maxam, A. M. & W. Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 5

60, 1977 等に記載される）やSanger法（例えばSanger, F. & A. R. Coulson, J. Mol. Biol., 94, 441, 1975, Sanger, F. & Nicklen and A. R. Coulson., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463, 1977等に記載される）に準じて解析することにより確認することができる。

【0005】このようにして取得される本発明遺伝子を、例えば、宿主細胞内で複製可能なDNAであって、宿主細胞からの単離、精製が可能であり、検出可能なマーカー遺伝子をもつベクターに、通常の遺伝子工学的手法を用いて組込むことにより本発明ベクターを構築することができる。本発明ベクターの構築に用いることができるベクターとしては、具体的には、微生物である大腸菌を宿主細胞とする場合、例えば、プラスミドpUC119（宝酒造（株）製）や、ファージミドpBluescriptII（ストラタジーン社製）等をあげることができ、酵母を宿主細胞とする場合は、プラスミドpACT2（Clontech社製）などをあげることができる。また、哺乳類動物細胞を宿主細胞とする場合は、pRC/RSV、pRC/CMV（Invitrogen社製）等のプラスミド、ウシバヒローマウイルスプラスミドpBPV（ファルマシア社製）、EBウイルスプラスミドpCEP4（Invitrogen社製）等のウイルス由来の自律複製起点を含むベクター、ワクシニアウイルス等のウイルスなどをあげることができ、昆虫類動物細胞（以下、昆虫細胞と記す。）を宿主細胞とする場合は、バキュロウイルス等の昆虫ウイルスをあげることができる。バキュロウイルスやワクシニアウイルス等のウイルスに本発明遺伝子を組込むには、使用しようとするウイルスのゲノムと相同な塩基配列を含有するトランスファーベクターを用いる。このようなトランスファーベクターの具体的例としては、Pharminogen社から市販されているpVL1392, pVL1393（Smith, G. E., Summers, M. D. et al., Mol. Cell. Biol., 3:2156-2165, 1983）、pSEB5（Funahashi, S. et al., J. Virol., 65:5584-5588, 1991）などのプラスミドをあげることができる。本発明遺伝子を前記のようなトランスファーベクターに挿入し、該トランスファーベクターとウイルスゲノムとを同時に宿主細胞に導入すると、トランスファーベクターとウイルスゲノムとの間で相同組換えが起こり、本発明遺伝子がゲノム上に組み込まれたウイルスを得ることができる。ウイルスゲノムとしては、Baculovirus, Adenovirus, Vacciniavirusなどのゲノムを用いることができる。本発明遺伝子の上流に、宿主細胞で機能可能なプロモーターを機能可能な形で結合させ、これを上述のようなベクターに組み込むことにより、本発明遺伝子を宿主細胞で発現させることの可能な本発明ベクター（以下、本発明発現ベクターと記す。）を構築することができる。ここで、「機能可能な形で結合させる」とは、本発明遺伝子が導入される宿主細胞においてプロモーターの制御下に発現するように、該プロモーターと本発明遺伝子とを結合させることを意味する。使用するプロモーターは、形質転換する宿主細胞内でプロモータ

一活性を示すものであれば特に制限はなく、例えば、宿主細胞が動物細胞や分裂酵母である場合は、例えば、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、シミアンウイルス(SV40)の初期もしくは後期プロモーター、マウス乳頭腫ウイルス(MMTV)プロモーター、単純ヘルペスウイルス(HSV)のチミシンキナーゼ(tk)遺伝子プロモーター等をあげることができる。宿主細胞が出芽酵母である場合はADHIプロモーターなどをあげることができる。また、宿主細胞において機能するプロモーターをあらかじめ保有するベクターを使用する場合は、ベクター保有のプロモーターと本発明遺伝子とが機能可能な形で結合するように、該プロモーターの下流に本発明遺伝子を挿入すればよい。例えば、前述のプラスミドpRC/RSV、pRC/CMV等は、動物細胞で機能可能なプロモーターの下流にクローニング部位が設けられており、該クローニング部位に本発明遺伝子を挿入し動物細胞へ導入すれば、本発明遺伝子が発現する。これらのプラスミドにはあらかじめSV40の自律複製起点(ori)が組み込まれているため、ori(-)のSV40ゲノムで形質転換された培養細胞、例えばCOS細胞等に該プラスミドを導入すると、細胞内でプラスミドのコピー数が非常に増大し、結果として該プラスミドに組み込まれた本発明遺伝子を大量発現させることもできる。また、前述の酵母用プラスミドpACT2はADHIプロモーターを有しており、該プラスミドまたはその誘導体のADHIプロモーターの下流に本発明遺伝子を挿入すれば、本発明遺伝子を例えばCG1915(Clontech社製)等の出芽酵母内で大量発現させることが可能な本発明ベクターが構築できる。

【0006】上述のようにして構築された本発明ベクターを宿主細胞に導入することにより、本発明形質転換体を取得することができる。本発明ベクターを宿主細胞へ導入する方法は、形質転換される宿主細胞に応じて通常用いられる方法でよい。例えば、大腸菌を宿主細胞とする場合は、「モレキュラー・クローニング」(J.Sambrookら、コールド・スプリング・ハーバー、1989年)等に記載される塩化カルシウム法やエレクトロポレーション法等を用いることができ、酵母菌を宿主細胞とする場合は、例えばリチウム法に基づくYeast transformation kit(Clontech社製)などを用いてベクターを導入することができる。また、哺乳類動物細胞や昆虫細胞等の動物細胞を宿主細胞とする場合は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション法、またはリポフェクション法等により該宿主細胞に本発明ベクターを導入することができる。尚、ウイルスをベクターに用いる場合は、上述のような一般的な遺伝子導入法によりウイルスゲノムを宿主細胞に導入できるほか、ウイルスゲノムを含有するウイルス粒子を宿主細胞へ感染させることによってウイルスゲノムを宿主細胞に導入することができる。

【0007】本発明形質転換体の選抜は、導入された本発明ベクターが有する検出マーカー遺伝子の性質に応じた方法を用いればよい。例えば、検出マーカー遺伝子が、細胞致死活性を示す薬剤に対する耐性遺伝子である場合には、該薬剤を添加した培地を用いて、本発明ベクターを導入した細胞を培養すればよい。このようにして用いることのできる薬剤耐性遺伝子と選抜薬剤との組み合わせとしては、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子とネオマイシンとの組合せ、ハイクロマイシン耐性遺伝子とハイクロマイシンとの組み合わせ、ブラストサイジンS耐性遺伝子とブラストサイジンSとの組合せ等をあげることができる。また、検出マーカー遺伝子が、宿主細胞の栄養要求性を相補する遺伝子である場合には、該栄養素を含まない最少培地を用いて、本発明ベクターを導入した細胞を培養すればよい。さらに、本発明発現ベクターを導入した場合は、エストロジェン結合活性に基づく検出方法を用いることもできる。本発明遺伝子が宿主細胞の染色体に導入されてなる本発明形質転換体を取得するには、例えば、本発明ベクターを制限酵素等で消化することにより直鎖上にした後、これを前述の方法で宿主細胞へ導入して該細胞を通常数週間培養し、導入された本発明ベクターにコードされる検出マーカーを指標にして目的とする形質転換体を選抜すればよい。例えば、上記のような選抜薬剤に対する耐性遺伝子を検出マーカー遺伝子として持つ本発明ベクターを前述の方法で宿主細胞に導入し、選抜薬剤を添加した培地で数週間以上該細胞を継代培養して、コロニー状に生き残った選抜薬剤耐性コロニーをピペットで吸い上げ純化することにより、本発明遺伝子が宿主細胞の染色体に導入されてなる本発明形質転換体を取得することができる。該形質転換体は、凍結保存が可能であり必要に応じて起眠して使用することできるので、一過性の遺伝子導入株と比較して、形質転換体作製の手間を省くことができ、形質転換体の性能を一定に保つこともできる。

【0008】上述のようにして得られた本発明形質転換体を培養することにより本発明のエストロジェンレセプターを産生させることができる。例えば、本発明形質転換体が微生物である場合、該形質転換体は、一般微生物における通常の培養に使用される炭素源や窒素源、有機ないし無機塩等を適宜含む各種の培地を用いて培養すればよい。培養は、一般微生物における通常の方法に準じて行い、固体培養、液体培養(試験管振とう式培養、往復式振とう培養、ジャーフェーマンター(Jar Fermenter)培養、クランク培養等)等が可能である。培養温度は、微生物が生育する範囲で適宜変更でき、例えば、約15℃〜約10℃の培養温度、約6〜約8のpHで培養するとよい。培養時間は、種々の培養条件によって異なるが、通常約1〜約5日間である。また、上記形質転換体が動物細胞である場合、一般の培養細胞における通常の培養に使用される培地を用いて培養すればよい。選

選択剤を利用して当該形質転換体を選抜した場合は、対応する選択剤を共存させて培養するのが望ましい。哺乳類動物細胞の場合、例えば10v/v%となるようFBSを添加したDMEM培地等の培地を用いて、37℃、5v/v%CO<sub>2</sub>存在下等にて、培地を数日ごとに交換しながら培養する。細胞がコンフルエントになるまで増殖したら、0.25w/v%程度のトリプシンPBS溶液を用いて個々の細胞に分散させ、数倍に希釈して新しい培養容器に播種し培養を続ける。目的とする量まで細胞が増殖したら細胞を集める。昆虫細胞の場合も同様に、10v/v%FBSおよび2w/v%Yeastlateを含むGrace's medium等の昆虫細胞用培地を用いて25℃から35℃で継代培養する。ただし、Sf21細胞などの培養容器からはがれやすい細胞の場合は、トリプシン液ではなくヒパッティンにより細胞を分散させ継代を行なう。また、Baculovirus等のウイルスベクターを含む形質転換体の場合は、細胞質効果により細胞が死滅する前、例えば培養開始から72時間目までに培養を終了することが好ましい。本発明形質転換体により産生されたエストロゲンレセプターの回収は、適宜、通常の単離、精製の方法を組み合わせて行えば良く、例えば、培養終了後、形質転換体の細胞を遠心分離等で集め、該細胞を通常のバッファー、例えば、20mM HEPES pH7.1mM EDTA、1mM DTT、0.5mM PMSFからなるバッファー等に懸濁した後、ポリトロン、超音波、ダウンスホモジナイザー等を用いて細胞を破碎し、破碎液を数万×gで数十分から1時間程度遠心分離し、上清画分を回収することにより、エストロゲンレセプターを含む画分を得ることができる。さらに、前記上清画分をイオン交換、疎水、ゲルろ過、アフィニティ等の各種クロマトグラフィーに供することにより、より精製されたエストロゲンレセプターを回収することもできる。この際、後述のエストロゲンレセプターが結合する塩基配列を含む15bpから200bp程度の長さのオリゴヌクレオチドをフローブとしたDNA結合アッセイなどにより、目的とするエストロゲンレセプターを含む画分を見分けることができる。このようにして製造された本発明のエストロゲンレセプターは、例えば、エストロゲンレセプターに対する化学物質の親和性を測定するためのラジオレセプターアッセイ等に用いることができる。

【0009】上述のようにして構築された本発明発現ベクターは、例えば、化学物質のエストロゲンレセプター活性化能を評価するためのレポーターアッセイに利用することができる。具体的には、エストロゲン応答配列を有しエストロゲンレセプターにより転写が制御される遺伝子、例えばヒタロゲン遺伝子の転写制御領域の下流にレポーター遺伝子を結合させたキメラ遺伝子、または、エストロゲン応答配列の下流に転写開始に必要な塩基配列とレポーター遺伝子とを結合させたキメラ遺伝子（以下、本キメラ遺伝子と記す。）を、細胞内でのエストロゲンレセプターの転写調節能をモニタ

ーするためのレポーター遺伝子として用いる。エストロゲン応答配列（estrogen response element）とは、エストロゲンにより転写が制御される遺伝子のプロモーターの上流に存在し、エストロゲンレセプターによって認識される塩基配列を意味する。エストロゲンの結合したエストロゲンレセプターは活性化されてエストロゲン応答配列に結合することにより、該配列の下流にある遺伝子の転写を促進する。エストロゲン応答配列のコンセンサス配列としては、塩基配列 AGGTCAXX TGACCT（Xは、A、G、C、またはTを意味する。）が一般に知られている。レポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ遺伝子、分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子、βガラクトシダーゼ遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、成長ホルモン遺伝子などが利用できる。上述のように作製した本発明発現ベクターと、本キメラ遺伝子を組み込んだベクターとを、内在性のエストロゲンレセプターを産生していない宿主細胞、例えばHeLa細胞やNIH3T3細胞などに導入し形質転換体を取得する。この形質転換体をそのまま1日から数日間培養する間に、例えばエストロゲン様作用をもつ化学物質を培地中に加えて前記形質転換体に作用させる。該形質転換体が産生するエストロゲンレセプターが化学物質の結合により活性化された場合は、レポーター遺伝子のmRNAへの転写が促進され、ルシフェラーゼ酵素蛋白質が形質転換体の細胞内に蓄積する。この状態の形質転換体を破碎して細胞粗抽出物を調製し、レポーターの酵素活性等を指標にして細胞当たりのレポーター蛋白質の量を求める。例えば、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いた場合、前記細胞粗抽出物にルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを加えると発光し、発光量はルシフェラーゼ量に比例する。従って、この発光量をルミノメーター等の測定装置で測定することにより、ルシフェラーゼ遺伝子の発現量がわかり、よって、その際に添加されていた化学物質のエストロゲンレセプター活性化能を評価することができる。また、本発明発現ベクターと、本キメラ遺伝子が組み込まれたベクターとを同時に宿主細胞に導入して、本発明遺伝子および本キメラ遺伝子が宿主細胞の染色体に導入されてなる形質転換体を取得し、上記レポーターアッセイに用いてもよい。該形質転換体は凍結保存が可能であり必要に応じて起眠して使用することができるので、これを一旦取得すると、アッセイの度ごとにこれらの遺伝子を宿主細胞に導入して新たな形質転換体を取得する必要が無く、また、形質転換体の性能を一定に保つこともできることから、例えばハイスループットスクリーニング等の自動化された大規模スクリーニングを実施する際に有用である。

【0010】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例によって限定されるもの

ではない。

#### 【0011】実施例1（本発明遺伝子の取得）

餌（コイ稚魚用）に $\beta$ -エストラジオール（和光純薬工業株式会社製）10mg/lを10mg/g餌となるように添加し、これにアセトンを加えてよく混和した後、ヘアードライヤーの下でアセトンを除去した。こうして得た処理餌を、約3ヶ月のヒメダカ雄10個体に3回1日の頻度で1日間飽食量与えた。 $\beta$ -エストラジオール投与24時間後、これらのヒメダカから内臓を摘出し、直ちに組織1

XU1: 5'-ATG TAC CTT GAA GAG AGC CGG G-3' (22mer, GC/AT = 13/9)

XU14: 5'-TCA GTC TTG AAG GGC CGG GGA G-3' (22mer, GC/AT = 14/8)

次いで、前記RT-PCRで得られたDNA断片をpCR2.1 (TA cloningベクター)にサブクローニングして大腸菌DH5- $\alpha$ に導入し、プラスミドを調製した(pCR-ER)。pCR2.1の塩基配列に基づくプライマーおよび上記のプライマー (XU1, XU14)を用い、ABI sequence systemで、前記のpCR-ERにクローニングされたDNA断片の塩基配列を決定し

た。その結果、配列番号2で示される塩基配列が明らか

XU36: 5'-AAG CTT CAT GAG TAA GAG ACA GAG C-3' (25mer, GC/AT = 11/14)

XU14: 5'-TCA GTC TTG AAG GGC CGG GGA G-3' (22mer, GC/AT = 14/8)

次いで、前記RT-PCRで得られたDNA断片をpCR2.1 (TA cloningベクター)にサブクローニングして大腸菌DH5- $\alpha$ に導入し、プラスミドを調製した(pCR-ER2)。pCR2.1の塩基配列に基づくプライマーおよび上記のプライマー (XU36, XU14)を用い、ABI sequence systemで、前記のpCR-ER2にクローニングされたDNA断片の塩基配列を決定した。その結果、配列番号1で示される塩基配列が明らかとなった。

#### 【0012】実施例2（本発明遺伝子発現用ベクターの構築）

実施例1で得られたプラスミドpCR-ERからエストロジェンレセプター遺伝子をXba I とHind IIIで切り出し、同じ制限酵素で消化した発現ベクターpRC/RSVに組み込み、エストロジェンレセプターを発現させるための発現

オリゴヌクレオチド1:

5'-CCA AAG TCA GGT CAC AGT GAC CTG ATC AAA GGA AC-3'

オリゴヌクレオチド2:

5'-CTT TGA TCA GGT CAC TGT GAC CTG ACT TTG GGT TC-3'

両オリゴヌクレオチドの末端をカイネーションによりリン酸化した。カイネーション反応液は、10 nmolのオリゴヌクレオチド1または10 nmolのオリゴヌクレオチド2、2.5  $\mu$ lの10 Xカイネーションバッファー、1  $\mu$ lの10 mMのATP、2.5  $\mu$ lのポリヌクレオチドキナーゼ（宝酒造社製）を1.5 ml容チューブに採り、液面を蒸留水を加えて全量を50  $\mu$ lとして調製した。カイネーション反応は37°Cで1時間行った。反応終了後、リン酸化したオリゴヌクレオチド1とオリゴヌクレオチド2をアニーリングさせ、2本鎖のEREを得た。アニーリング反応液は、リン酸化させたオリゴヌクレオチド1およびオリゴヌクレオチド2のそれぞれ20  $\mu$ lずつを、1.5 ml容チュー

gあたり10mlのトリゾール試薬を加えてホモジナイズした後、クロロホルムを加えて遠心分離した。水相を採取してイソプロパノールを加えてRNAを沈澱させた。約0.3g、約500  $\mu$ gのRNAが得られた。このようにして調製したRNA 1  $\mu$ gを鋳型とし、ランダム9merプライマーを用い、予め30°Cで10分間逆転写反応を行い、引き続き42°Cで50分間逆転写反応を行った。続いて下記のプライマー (XU1とXU14)を用いPCR (30サイクル、94°C 30sec-1min、50-60°C 1-1.5min、72°C 1-3min)を行った。

となった。また、上記のようにして調製したRNA 1  $\mu$ gを鋳型とし、ランダム9merプライマーを用い、予め30°Cで10分間逆転写反応を行い、引き続き42°Cで50分間逆転写反応を行った。続いて下記のプライマー (XU36とXU14)を用いPCR (30サイクル、94°C 30sec-1min、50-60°C 1-1.5min、72°C 1-3min)を行った。

ベクターRSV-ERを構築した。具体的な過程を図1に、発現ベクターRSV-ERの構造の詳細を図2示す。また、同様にして、実施例1で得られたプラスミドpCR-ER2からエストロジェンレセプター遺伝子をXba I とHind IIIで切り出し、同じ制限酵素で消化した発現ベクターpRC/RSVに組み込み、エストロジェンレセプターを発現させるための発現ベクターRSV-ER2を構築した。

#### 【0013】実施例3（エストロジェンレセプターに応答するレポーター遺伝子を有するベクターの構築）

既知のセノフスのA2ビテロジェニン遺伝子 (GenBank Accession No. X00205) の5'末端領域のエストロジェン応答配列（以下、EREと記す）のコンセンサス配列をもとに、下記のオリゴヌクレオチド1およびオリゴヌクレオチド2を合成した。

ープに加え、95°Cで5分間保温し、60°C、次いで37°Cにてそれぞれ1時間保温した後、室温で約1時間放置した。反応終了後、10  $\mu$ lのアニーリング反応液に10  $\mu$ lのDNAリガーゼ（ライゲーションキット、宝酒造社製）を加え、2本鎖のERE断片を連結した。反応液をアガロースゲル電気泳動に供してDNA断片の長さを分析し、ERE断片が4個連結されたと判断されるDNA断片（以下、4 X ERE断片と記す。）およびERE断片が5個連結されたと判断されるDNA断片（以下、5 X ERE断片と記す。）をそれぞれ回収した。これらのDNA断片をブランチングキット（宝酒造社製）を用い、末端を平滑化した。一方、pBluescript (Sk-)を制限酵素EcoR I (宝酒

造社製)で切断し、5'末端をアルカリフォスフェターゼ(宝酒造社製)で脱リン酸化した。前記のDNA断片(4 X ERE断片または5 X ERE断片)とpBluescript(SK-)とをそれぞれDNAライゲーションキットを用いて結合した。得られた反応液で大腸菌DH5 $\alpha$ のコンピテントセル(東洋紡社製)を形質転換してアンピシリン耐性となった株を選抜し、該アンピシリン耐性株からプラスミドDNAを調製し、塩基配列をABI PRISM<sup>®</sup> 377 DNA Sequence System(パーキンエルマージャパン社製)で確認した。次に、HSV tkプロモーター配列を持つベクターpTK $\beta$ (クロンテック)を制限酵素Sal IおよびXho I(それぞれ宝酒造社とニッポンジーン社製)で切断した後アガロースゲル電気泳動で分析し、約1 kbpのtkプロモーター断片を得た。該断片をランディングキットを用い、末端を平滑化した。一方、ルシフェラーゼ遺伝子を持つレポータープラスミドpGL-3(ピッカジーン)を制限酵素Sma I(宝酒造社製)で切断し、5'末端をアルカリフォスフェターゼ(宝酒造社製)で脱リン酸化した。2つのDNA断片をDNAライゲーションキットを用いて結合した。得られた反応液で大腸菌DH5 $\alpha$ のコンピテントセル(東洋紡)を形質転換してアンピシリン耐性となった株を選抜し、該アンピシリン耐性株からプラスミドDNAを調製し、tkプロモーター挿入したレポータープラスミド(tk-pGL-3)を取得した。次に、上記の4 X ERE断片が挿入されたpBluescriptを制限酵素Kpn IおよびXba I(それぞれ宝酒造社とニッポンジーン社製)で切断し、アガロースゲル電気泳動で4 X ERE断片を回収した。一方、tk-pGL-3をKpn IおよびNhe I(いずれも宝酒造社製)で消化し、5'末端をアルカリフォスフェターゼ(宝酒造社製)で脱リン酸化した。このようにして調製された4 X ERE断片とtk-pGL-3とをDNAライゲーションキットを用いて結合した。得られた反応液で大腸菌DH5 $\alpha$ 株のコンピテントセル(東洋紡)を形質転換してアンピシリン耐性となった株を選抜し、該アンピシリン耐性株からプラスミドDNAを調製し、4 X ERE断片およびtkプロモーター断片を保有するレポータープラスミド(ERE-tk-pGL)を取得した。該プラスミドの構築の過程を図3に、該プラスミドの構造を図4に示す。また、同様にして、上記の5 X ERE断片が挿入されたpBluescriptから5 X ERE断片を回収し、該断片と、Kpn IおよびNhe Iで消化されたtk-pGL-3とを結合させ、5 X ERE断片およびtkプロモーター断片を保有するレポータープラスミド(ERE5-tk-pGL)を取得した。

#### 【0011】実施例1(プラスミドDNAの大量調製)

実施例2で得られた発現ベクターRSV-ER、レポータープラスミドERE-tk-pGLおよびERE5-tk-pGL、ならびにコントロールレポータープラスミドであるpRL-tk(ピッカジーン)のDNAを以下の方法より大量に調製した。上記プラスミドを含む大腸菌をアンピシリン(終濃度50  $\mu$ g/ml)を含有LB培地3mlに接種し、37°Cで一晩振動培養した。そ

の培養液をアンピシリン(50  $\mu$ g/ml)を含むLB培地200mlに接種し、一晩振動培養した。一晩培養後の菌体を5,000 rpm、10分間、4°Cで遠心分離し(CR21、日立工機)、得られた沈澱を0.1 MのSTEバッファー60 mlに懸濁し、同条件で再度遠心分離した。沈澱を3 mlのsolution 1に懸濁し、1 mlのリゾチーム(20 mg/ml)を加え、室温で5分間放置した。引き続き10 mlのSolution 2を加え、氷上に10分間放置した後、7.5 mlのsolution 3を加え、氷上に15分間放置した。12,000 rpm、20分、4°Cで遠心分離し、上清を50 mlチューブに移し、0.6容量のイソプロピルアルコールを加え、室温で15分間放置した。3,000 rpm、10分間、室温で遠心分離し(CR5DL、日立工機)、70%エタノールで洗浄し、乾燥させた。沈澱を4.2 mlのTEバッファーに溶かし、5 mg/ml Rnase溶液(ニッポンジーン)を28  $\mu$ l加え、50°C、30分間インキュベートした。2 mg/mlエチジウムブロマイド溶液400  $\mu$ lとCsCl(関東化学)4.6 gを加えた後、日立工機シールチューブに移し、55,000 rpm、20°C、16時間遠心分離(S CS5H2、日立工機)した。スーパーコイルドプラスミドDNAのバンドを注射筒で抜き取り、55,000 rpm、20°C、16時間再度遠心分離した。再びスーパーコイルプラスミドDNAのバンドを注射筒で抜き取り、水飽和イソアミルアルコールでエチジウムブロマイドを完全に除き、一晩5 mM STEバッファーに透析した後、試料として用いた。

#### 【0015】実施例5(細胞の培養)

不活化済み牛胎仔血清(GIBCO-BRL、米国)を活性炭-デキストランで処理し、細胞培養の培地作製に用いた。処理過程における各ステップは以下の通りであった。25 Mスクロース(和光純薬)、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>(和光純薬)、10 mM HEPES(pH7.4)(同仁化学、熊本)1L中にノーリットEXW(ナカライテスク)2.5gとデキストランT-70(ファルマシアバイオテック、スウェーデン)0.25gを懸濁し、4°Cで終夜攪拌した。本懸濁液を12,000rpmで10分遠心(CR21、日立工機)して活性炭を沈殿させた。これを不活化済み牛胎仔血清(GIBCO-BRL、米国)1Lに懸濁し、4°Cで終夜攪拌した。その後、12,000rpmで10分遠心(CR21、日立工機)して活性炭を沈殿させ、取り除いた。以上の操作を2回繰り返した後、ザルトラプV500(0.20  $\mu$ m、ザルトリウス、独国)を用いてフィルター過したろ液を活性炭-デキストラン処理済みの牛胎仔血清とした。ヒト子宮癌細胞株Hela(大日本製薬製)を、10%活性炭-デキストラン処理済みの牛胎仔血清、0.03% L-グルタミン(日本製薬)および0.15%炭酸水素ナトリウムを添加したイーグルMEM(日本製薬)培地を用いて10 cmの組織培養用ディッシュ(ファルコン)に培養した。細胞の継代・播種は培地を除去後、適量のPBS(-)(日本製薬)で接着した細胞を洗浄し、PBS(-)80mlに5%トリプシン(DIFCO、米国)10ml、0.2% EDTA・3 Na(同仁化学)10mlを添加した液を用いて細胞を剥離した。細胞の培養はすべて5% CO<sub>2</sub>および飽和湿度下、37°C



始め、10 $\mu$ Mでは活性化倍率は溶媒コントロール（DMSOのみ添加）の約5倍に上昇した（図10、11）。酢酸トリブチルすずまたはフタル酸ジ-2-エチルヘキシルでは活性の上昇は認められなかった（図12、13）。さらに上記4種について50 $\mu$ Mでの実験も行った。その結果を図14に示した。ビスフェノールAで更なる活性の上昇を認めた。ノニルフェノールにおいては細胞に対する毒性に起因すると思われる活性の低下が認められた。

<:110>: Sumitomo Chemical Company Limited

<:120>: Estrogen receptor genes

<:130>: P150237

<:150>: JP 10/319465

<:151>: 1998-11-10

<:160>: 4

<:210>: 1

<:211>: 575

<:212>: PKT

<:213>: Oryzias latipes

<:400>: 1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Tyr | Pro | Glu | Glu | Ser | Arg | Gly | Ser | Gly | Gly | Val | Ala | Ala | Val | Asp |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Leu | Leu | Glu | Gly | Thr | Tyr | Asp | Tyr | Ala | Ala | Pro | Asn | Pro | Ala | Thr | Thr |
|     |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |
| Pro | Leu | Tyr | Ser | Gln | Ser | Ser | Thr | Gly | Tyr | Tyr | Ser | Ala | Pro | Leu | Glu |
|     |     |     | 35  |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Thr | Asn | Gly | Pro | Pro | Ser | Glu | Gly | Ser | Leu | Gln | Ser | Leu | Gly | Ser | Gly |
|     |     |     | 50  |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Pro | Thr | Ser | Pro | Leu | Val | Phe | Val | Pro | Ser | Ser | Pro | Arg | Leu | Ser | Pro |
|     |     |     | 65  |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |
| Phe | Met | His | Pro | Pro | Ser | His | His | Tyr | Leu | Glu | Thr | Thr | Ser | Thr | Pro |
|     |     |     |     |     | 85  |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Val | Tyr | Arg | Ser | Ser | His | Gln | Gly | Ala | Ser | Arg | Glu | Asp | Gln | Cys | Gly |
|     |     |     |     | 100 |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Ser | Arg | Glu | Asp | Thr | Cys | Ser | Leu | Gly | Glu | Leu | Gly | Ala | Gly | Ala | Gly |
|     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |
| Ala | Gly | Gly | Phe | Glu | Met | Ala | Lys | Asp | Thr | Arg | Phe | Cys | Ala | Val | Cys |
|     |     |     | 130 |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Ser | Asp | Tyr | Ala | Ser | Gly | Tyr | His | Tyr | Gly | Val | Trp | Ser | Cys | Glu | Gly |
|     |     |     | 145 |     |     |     | 150 |     |     |     | 155 |     |     | 160 |     |
| Cys | Lys | Ala | Phe | Phe | Lys | Arg | Ser | Ile | Gln | Gly | His | Asn | Asp | Tyr | Met |
|     |     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     | 175 |     |
| Cys | Pro | Ala | Thr | Asn | Gln | Cys | Thr | Ile | Asp | Arg | Asn | Arg | Arg | Lys | Gly |
|     |     |     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     | 190 |     |

【0020】参考例1（他の細胞用いたアッセイ）

他の種類の培養細胞を選び、実施例5〜9と同様の実験を行う。

【0021】

【発明の効果】メダカエストロゲンレセプターをコードする遺伝子、および、化学物質の該レセプター活性化能を評価するための試験系等が提供可能となる。

【0022】

【配列表】

Cys Gln Ala Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys  
 195 200 205  
 Gly Gly Val Arg Lys Asp Arg Ile Arg Ile Leu Arg Arg Asp Lys Arg  
 210 215 220  
 Arg Thr Gly Val Gly Asp Gly Asp Lys Val Val Lys Gly Gln Glu His  
 225 230 235 240  
 Lys Thr Val His Tyr Asp Gly Arg Lys Arg Ser Ser Thr Gly Gly Gly  
 245 250 255  
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg Leu Ser Val Thr Ser Ile Pro Pro Glu  
 260 265 270  
 Gln Val Leu Leu Leu Leu Gln Gly Ala Glu Pro Pro Ile Leu Cys Ser  
 275 280 285  
 Arg Gln Lys Leu Ser Arg Pro Tyr Thr Glu Val Thr Met Met Thr Leu  
 290 295 300  
 Leu Thr Ser Met Ala Asp Lys Glu Leu Val His Met Ile Ala Trp Ala  
 305 310 315 320  
 Lys Lys Leu Pro Gly Phe Leu Gln Leu Ser Leu His Asp Gln Val Leu  
 325 330 335  
 Leu Leu Glu Ser Ser Trp Leu Glu Val Leu Met Ile Gly Leu Ile Trp  
 340 345 350  
 Arg Ser Ile His Cys Pro Gly Lys Leu Ile Phe Ala Gln Asp Leu Ile  
 355 360 365  
 Leu Asp Arg Asn Glu Gly Asp Cys Val Glu Gly Met Thr Glu Ile Phe  
 370 375 380  
 Asp Met Leu Leu Ala Thr Ala Ser Arg Phe Arg Val Leu Lys Leu Lys  
 385 390 395 400  
 Pro Glu Glu Phe Val Cys Leu Lys Ala Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly  
 405 410 415  
 Ala Phe Ser Phe Cys Thr Gly Thr Met Glu Pro Leu His Asn Ser Ala  
 420 425 430  
 Ala Val Gln Ser Met Leu Asp Thr Ile Thr Asp Ala Leu Ile His Tyr  
 435 440 445  
 Ile Ser Gln Ser Gly Tyr Leu Ala Gln Glu Gln Ala Arg Arg Gln Ala  
 450 455 460  
 Gln Pro Leu Leu Leu Leu Ser His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly  
 465 470 475 480  
 Met Glu His Leu Tyr Ser Met Lys Cys Lys Asn Lys Val Pro Leu Tyr  
 485 490 495  
 Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu Asp Ala His Arg Leu His His Pro Val  
 500 505 510  
 Arg Ala Pro Gln Ser Leu Ser Gln Val Asp Arg Asp Pro Pro Ser Thr  
 515 520 525  
 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ile Ala Pro Gly Ser Ile Ser Ala Ser Arg  
 530 535 540  
 Gly Arg Ile Glu Ser Pro Ser Arg Gly Pro Phe Ala Pro Ser Val Leu  
 545 550 555 560  
 Gln Tyr Gly Gly Ser Arg Pro Asp Cys Thr Pro Ala Leu Gln Asp  
 565 570 575

&lt;:210&gt;: 2

&lt;211&gt;: 1728

&lt;212&gt;: DNA

&lt;213&gt;: Oryzias latipes

&lt;220&gt;:

&lt;221&gt;: CDS

&lt;222&gt;: (1)...(1728)

&lt;400&gt;: 2

|   |     |
|---|-----|
| atg tac cct gaa gag age egg ggt tct gga ggg gtg gct gct gtg gac | 48  |
| Met Tyr Pro Glu Glu Ser Arg Gly Ser Gly Gly Val Ala Ala Val Asp |     |
| 1 5 10 15   |     |
| ctt ttg gaa ggg acg tac gac tat gcc gcc ccc aac cct gcc acg act | 96  |
| Leu Leu Glu Gly Thr Tyr Asp Tyr Ala Ala Pro Asn Pro Ala Thr Thr |     |
| 20 25 30  |     |
| ccc ctt tac age cag tcc age acc gcc tac tac tct gct ccc ctg gaa | 144 |
| Pro Leu Tyr Ser Gln Ser Ser Thr Gly Tyr Tyr Ser Ala Pro Leu Glu |     |
| 35 40 45  |     |
| aca aac gga ccc ccc tca gaa gcc agt ctg cag tcc ctg gcc agt ggg | 192 |
| Thr Asn Gly Pro Pro Ser Glu Gly Ser Leu Gln Ser Leu Gly Ser Gly |     |
| 50 55 60  |     |
| cgg acg age cct ctg gtg ttt gtg ccc tcc age ccc aga ctc agt ccc | 240 |
| Pro Thr Ser Pro Leu Val Phe Val Pro Ser Ser Pro Arg Leu Ser Pro |     |
| 65 70 75 80   |     |
| ttt atg cat cca ccc age cac cac tat ctg gaa acc act tcc acg ccc | 288 |
| Phe Met His Pro Pro Ser His His Tyr Leu Glu Thr Thr Ser Thr Pro |     |
| 85 90 95  |     |
| ggt tac aga tcc age cac cag gga gcc tcc agg gag gac cag tgc gcc | 336 |
| Val Tyr Arg Ser Ser His Gln Gly Ala Ser Arg Glu Asp Gln Cys Gly |     |
| 100 105 110   |     |
| tcc egg gag gac acg tgc age ctg ggg gag tta gcc gcc gga gcc ggg | 384 |
| Ser Arg Glu Asp Thr Cys Ser Leu Gly Glu Leu Gly Ala Gly Ala Gly |     |
| 115 120 125   |     |
| gct ggg ggg ttt gag atg gcc aaa gac acg cgt ttc tgc gcc gtg tgc | 432 |
| Ala Gly Gly Phe Glu Met Ala Lys Asp Thr Arg Phe Cys Ala Val Cys |     |
| 130 135 140   |     |
| age gac tac gcc tct ggg tac cac tat ggg gtg tgg tct tgt gag gcc | 480 |
| Ser Asp Tyr Ala Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly |     |
| 145 150 155 160   |     |
| tgc aag gcc ttc ttc aag agg age atc cag ggt cac aat gac tat atg | 528 |
| Cys Lys Ala Phe Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met |     |
| 165 170 175   |     |
| tgc cca ggg acc aat cag tgc act att gac aga aat cga agg aag gcc | 576 |
| Cys Pro Ala Thr Asn Gln Cys Thr Ile Asp Arg Asn Arg Arg Lys Gly |     |
| 180 185 190   |     |
| tgt cag gct tgt cgt ctt agg aag tgt tac gaa gtg gga atg atg aaa | 624 |
| Cys Gln Ala Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys |     |
| 195 200 205   |     |
| ggc ggt gtg cgc aag gac cgc att cgc att tta cgg cgt gac aaa cgg | 672 |
| Gly Gly Val Arg Lys Asp Arg Ile Arg Ile Leu Arg Arg Asp Lys Arg |     |

|   |     |     |      |
|---|-----|-----|------|
| 210   | 215 | 220 |      |
| egg aca ggc gtt ggt gat gga gac aag gtt gta aag ggt cag gag cat |     |     | 720  |
| Arg Thr Gly Val Gly Asp Gly Asp Lys Val Val Lys Gly Gln Glu His |     |     |      |
| 225   | 230 | 235 | 240  |
| aaa acg gtg cat tat gat gga agc aaa cgc agc agc aca gga gga gga |     |     | 768  |
| Lys Thr Val His Tyr Asp Gly Arg Lys Arg Ser Ser Thr Gly Gly Gly |     |     |      |
| 245   | 250 | 255 |      |
| gga gga gga gga gga gga aga ctg tet gtg acc agc ata cct cct gag |     |     | 816  |
| Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg Leu Ser Val Thr Ser Ile Pro Pro Glu |     |     |      |
| 260   | 265 | 270 |      |
| cag gtg ctg etc etc ett cag ggc gcc gag ccc ccc ata etc tgc tgc |     |     | 864  |
| Gln Val Leu Leu Leu Leu Gln Gly Ala Glu Pro Pro Ile Leu Cys Ser |     |     |      |
| 275   | 280 | 285 |      |
| cgt cag aag ttg agc cga ccc tac acc gag gtc acc atg atg acc ctg |     |     | 912  |
| Arg Gln Lys Leu Ser Arg Pro Tyr Thr Glu Val Thr Met Met Thr Leu |     |     |      |
| 290   | 295 | 300 |      |
| etc acc agc atg gca gac aag gag ctg gtc cac atg atc gcc tgg gcc |     |     | 960  |
| Leu Thr Ser Met Ala Asp Lys Glu Leu Val His Met Ile Ala Trp Ala |     |     |      |
| 305   | 310 | 315 | 320  |
| aag aag etc cca ggt ttt ctg cag ctg tcc ctg cac gat cag gtg ctg |     |     | 1008 |
| Lys Lys Leu Pro Gly Phe Leu Gln Leu Ser Leu His Asp Gln Val Leu |     |     |      |
| 325   | 330 | 335 |      |
| ctg ctg gag agc tgc tgg ctg gag gtg etc atg atc gcc etc att tgg |     |     | 1056 |
| Leu Leu Glu Ser Ser Trp Leu Glu Val Leu Met Ile Gly Leu Ile Trp |     |     |      |
| 340   | 345 | 350 |      |
| agg tcc atc cac tgt ccc ggg aag etc atc ttt gca caa gac etc atc |     |     | 1104 |
| Arg Ser Ile His Cys Pro Gly Lys Leu Ile Phe Ala Gln Asp Leu Ile |     |     |      |
| 355   | 360 | 365 |      |
| ctg gac agc aat gag gga gac tgc gtg gaa gcc atg acg gag atc ttc |     |     | 1152 |
| Leu Asp Arg Asn Glu Gly Asp Cys Val Glu Gly Met Thr Glu Ile Phe |     |     |      |
| 370   | 375 | 380 |      |
| gac atg ctg ctg gcc act get tcc cgc ttc cgt gtg etc aaa etc aaa |     |     | 1200 |
| Asp Met Leu Leu Ala Thr Ala Ser Arg Phe Arg Val Leu Lys Leu Lys |     |     |      |
| 385   | 390 | 395 | 400  |
| cct gag gaa ttc gtc tgc etc aaa get att att tta etc aac tcc ggt |     |     | 1248 |
| Pro Glu Glu Phe Val Cys Leu Lys Ala Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly |     |     |      |
| 405   | 410 | 415 |      |
| get ttt tet ttc tgc acc ggc acc atg gag cca ett cac aac agc gcc |     |     | 1296 |
| Ala Phe Ser Phe Cys Thr Gly Thr Met Glu Pro Leu His Asn Ser Ala |     |     |      |
| 420   | 425 | 430 |      |
| ggc gtt cag agc atg ctg gac acc atc aca gac gca etc att cat tac |     |     | 1344 |
| Ala Val Gln Ser Met Leu Asp Thr Ile Thr Asp Ala Leu Ile His Tyr |     |     |      |
| 435   | 440 | 445 |      |
| atc agt cag tgc ggt tac ttg gcc cag gag cag gcc aga cgg cag gcc |     |     | 1392 |
| Ile Ser Gln Ser Gly Tyr Leu Ala Gln Glu Gln Ala Arg Arg Gln Ala |     |     |      |
| 450   | 455 | 460 |      |
| cag cgc etc ctg ctg etc tcc cac atc agg cac atg agc aac aaa gcc |     |     | 1440 |
| Gln Pro Leu Leu Leu Leu Ser His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly |     |     |      |
| 465   | 470 | 475 | 480  |
| atg gag cac etc tac agc atg aag tgc aag aac aaa gtc cct ett tat |     |     | 1488 |

Met Glu His Leu Tyr Ser Met Lys Cys Lys Asn Lys Val Pro Leu Tyr  
 485 490 495  
 gag ctc cta ctg gag atg ctc gat gcc cac cgc ctg cac cac ccc gtc 1536  
 Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu Asp Ala His Arg Leu His His Pro Val  
 500 505 510  
 aga gcc ccc cag tcc ttg tcc caa gtc gac aga gac cct ccc tcc acc 1584  
 Arg Ala Pro Gln Ser Leu Ser Gln Val Asp Arg Asp Pro Pro Ser Thr  
 515 520 525  
 agc agc ggc ggc ggt gga atc gct ccc ggt tct ata tca gca tct cga 1632  
 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ile Ala Pro Gly Ser Ile Ser Ala Ser Arg  
 530 535 540  
 ggc aga atc gag ast ccc agc aga gcc ccc ttt gct ccc agt gtc ctt 1680  
 Gly Arg Ile Glu Ser Pro Ser Arg Gly Pro Phe Ala Pro Ser Val Leu  
 545 550 555 560  
 cag tat gga ggc tgc cgt cct gac tgc acc ccc gcc ctt caa gac tga 1728  
 Gln Tyr Gly Gly Ser Arg Pro Asp Cys Thr Pro Ala Leu Gln Asp  
 565 570 575

&lt;:210&gt;. 3

&lt;:211&gt;. 620

&lt;:212&gt;. Pfl

&lt;:213&gt;. Dryzias lapites

&lt;:400&gt;. 1

Met Ser Lys Arg Gln Ser Ser Val Gln Ile Arg Gln Leu Phe Gly Pro  
 1 5 10 15  
 Ala Leu Arg Ser Arg Ile Ser Pro Ala Ser Ser Glu Leu Glu Thr Leu  
 20 25 30  
 Ser Pro Pro Arg Leu Ser Pro Arg Asp Pro Leu Gly Asp Met Tyr Pro  
 35 40 45  
 Glu Glu Ser Arg Gly Ser Gly Gly Val Ala Ala Val Asp Leu Leu Glu  
 50 55 60  
 Gly Thr Tyr Asp Tyr Ala Ala Pro Asn Pro Ala Thr Thr Pro Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Ser Gln Ser Ser Thr Gly Tyr Tyr Ser Ala Pro Leu Glu Thr Asn Gly  
 85 90 95  
 Pro Pro Ser Glu Gly Ser Leu Gln Ser Leu Gly Ser Gly Pro Thr Ser  
 100 105 110  
 Pro Leu Val Phe Val Pro Ser Ser Pro Arg Leu Ser Pro Phe Met His  
 115 120 125  
 Pro Pro Ser His His Tyr Leu Glu Thr Thr Ser Thr Pro Val Tyr Arg  
 130 135 140  
 Ser Ser His Gln Gly Ala Ser Arg Glu Asp Gln Cys Gly Ser Arg Glu  
 145 150 155 160  
 Asp Thr Cys Ser Leu Gly Glu Leu Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Gly  
 165 170 175  
 Phe Glu Met Ala Lys Asp Thr Arg Phe Cys Ala Val Cys Ser Asp Tyr  
 180 185 190  
 Ala Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly Cys Lys Ala  
 195 200 205

Phe Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met Cys Pro Ala  
 210 215 220  
 Thr Asn Gln Cys Thr Ile Asp Arg Asn Arg Arg Lys Gly Cys Gln Ala  
 225 230 235 240  
 Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys Gly Gly Val  
 245 250 255  
 Arg Lys Asp Arg Ile Arg Ile Leu Arg Arg Asp Lys Arg Arg Thr Gly  
 260 265 270  
 Val Gly Asp Gly Asp Lys Val Val Lys Gly Gln Glu His Lys Thr Val  
 275 280 285  
 His Tyr Asp Gly Arg Lys Arg Ser Ser Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly  
 290 295 300  
 Gly Gly Gly Arg Leu Ser Val Thr Ser Ile Pro Pro Glu Gln Val Leu  
 305 310 315 320  
 Leu Leu Leu Gln Gly Ala Glu Pro Pro Ile Leu Cys Ser Arg Gln Lys  
 325 330 335  
 Leu Ser Arg Pro Tyr Thr Glu Val Thr Met Met Thr Leu Leu Thr Ser  
 340 345 350  
 Met Ala Asp Lys Glu Leu Val His Met Ile Ala Trp Ala Lys Lys Leu  
 355 360 365  
 Pro Gly Phe Leu Gln Leu Ser Leu His Asp Gln Val Leu Leu Leu Glu  
 370 375 380  
 Ser Ser Trp Leu Glu Val Leu Met Ile Gly Leu Ile Trp Arg Ser Ile  
 385 390 395 400  
 His Cys Pro Gly Lys Leu Ile Phe Ala Gln Asp Leu Ile Leu Asp Arg  
 405 410 415  
 Asn Glu Gly Asp Cys Val Glu Gly Met Thr Glu Ile Phe Asp Met Leu  
 420 425 430  
 Leu Ala Thr Ala Ser Arg Phe Arg Val Leu Lys Leu Lys Pro Glu Glu  
 435 440 445  
 Phe Val Cys Leu Lys Ala Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Ala Phe Ser  
 450 455 460  
 Phe Cys Thr Gly Thr Met Glu Pro Leu His Asn Ser Ala Ala Val Gln  
 465 470 475 480  
 Ser Met Leu Asp Thr Ile Thr Asp Ala Leu Ile His Tyr Ile Ser Gln  
 485 490 495  
 Ser Gly Tyr Leu Ala Gln Glu Gln Ala Arg Arg Gln Ala Gln Pro Leu  
 500 505 510  
 Leu Leu Leu Ser His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His  
 515 520 525  
 Leu Tyr Ser Met Lys Cys Lys Asn Lys Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu  
 530 535 540  
 Leu Glu Met Leu Asp Ala His Arg Leu His His Pro Val Arg Ala Pro  
 545 550 555 560  
 Gln Ser Leu Ser Gln Val Asp Arg Asp Pro Pro Ser Thr Ser Ser Gly  
 565 570 575  
 Gly Gly Gly Ile Ala Pro Gly Ser Ile Ser Ala Ser Arg Gly Arg Ile  
 580 585 590  
 Glu Ser Pro Ser Arg Gly Pro Phe Ala Pro Ser Val Leu Gln Tyr Gly  
 595 600 605

Gly Ser Arg Pro Asp Cys Thr Pro Ala Leu Gln Asp  
610 615

<:210>: 2  
<:211>: 1863  
<:212>: DNA  
<:213>: *Oryzias latipes*

<:220>:  
<:221>: CDS  
<:222>: (1)...(1863)

<:400>: 2  
atg agt aag aga cag agc teg gtg cag atc agg cag ctg ttc gga cca 48  
Met Ser Lys Arg Gln Ser Ser Val Gln Ile Arg Gln Leu Phe Gly Pro  
1 5 10 15  
gca ctc aga tcc agg atc agc cca gcc tcc tca gag ctg gag acc ctc 96  
Ala Leu Arg Ser Arg Ile Ser Pro Ala Ser Ser Glu Leu Glu Thr Leu  
20 25 30  
tcc cca cct cgc ctc teg ccc cgt gac ccc ctc ggt gac atg tac cct 144  
Ser Pro Pro Arg Leu Ser Pro Arg Asp Pro Leu Gly Asp Met Tyr Pro  
35 40 45  
gaa gag agc cgg ggt tct gga ggg gtg get get gtg gac ctt ttg gaa 192  
Glu Glu Ser Arg Gly Ser Gly Gly Val Ala Ala Val Asp Leu Leu Glu  
50 55 60  
ggg acg tac gac tat gcc gcc ccc aac cct gcc acg act ccc ctt tac 240  
Gly Thr Tyr Asp Tyr Ala Ala Pro Asn Pro Ala Thr Thr Pro Leu Tyr  
65 70 75 80  
agc cag tcc agc acc gcc tac tac tet get ccc ctg gaa aca aac gga 288  
Ser Gln Ser Ser Thr Gly Tyr Tyr Ser Ala Pro Leu Glu Thr Asn Gly  
85 90 95  
ccc ccc tca gaa gcc agt ctg cag tcc ctg gcc agt ggg cag acg agc 336  
Pro Pro Ser Glu Gly Ser Leu Gln Ser Leu Gly Ser Gly Pro Thr Ser  
100 105 110  
cct ctg gtg ttt gtg ccc tcc agc ccc aga ctc agt ccc ttt atg cat 384  
Pro Leu Val Phe Val Pro Ser Ser Pro Arg Leu Ser Pro Phe Met His  
115 120 125  
cca ccc agc cac cac tat ctg gaa acc act tcc acg ccc gtt tac aga 432  
Pro Pro Ser His His Tyr Leu Glu Thr Thr Ser Thr Pro Val Tyr Arg  
130 135 140  
tcc agc cac cag gga gcc tcc agg gag gac cag tgc gcc tcc cgg gag 480  
Ser Ser His Gln Gly Ala Ser Arg Glu Asp Gln Cys Gly Ser Arg Glu  
145 150 155 160  
gac acg tgc agc ctg ggg gag tta gcc gcc gga gcc ggg get ggg ggg 528  
Asp Thr Cys Ser Leu Gly Glu Leu Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Gly  
165 170 175  
ttt gag atg gcc aaa gac acg cgt ttc tgc gcc gtg tgc agc gac tac 576  
Phe Glu Met Ala Lys Asp Thr Arg Phe Cys Ala Val Cys Ser Asp Tyr  
180 185 190  
gcc tct ggg tac cac tat ggg gtg tgg tct tgt gag gcc tgc aag gcc 624

|   |      |     |     |
|---|------|-----|-----|
| Ala Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly Cys Lys Ala |      |     |     |
| 195   | 200  | 205 |     |
| Ulc Hlc aag agg age atc cag ggt cac aat gac tat atg tgc cca ggc | 672  |     |     |
| Phe Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met Cys Pro Ala |      |     |     |
| 210   | 215  | 220 |     |
| acc aat cag tgc act att gac aga aat cga agg aag ggc tgt cag gct | 720  |     |     |
| Thr Asn Gln Cys Thr Ile Asp Arg Asn Arg Arg Lys Gly Cys Gln Ala |      |     |     |
| 225   | 230  | 235 | 240 |
| tgt cgt ctt agg aag tgt tac gaa gtg gga atg atg aaa ggc ggt gtg | 768  |     |     |
| Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys Gly Gly Val |      |     |     |
| 245   | 250  | 255 |     |
| cgc aag gac cgc att cgc att tta cgg cgt gac aaa cgg cgg aca ggc | 816  |     |     |
| Arg Lys Asp Arg Ile Arg Ile Leu Arg Arg Asp Lys Arg Arg Thr Gly |      |     |     |
| 260   | 265  | 270 |     |
| gtt ggt gat gga gac aag gtt gta aag ggt cag gag cat aaa acg gtg | 864  |     |     |
| Val Gly Asp Gly Asp Lys Val Val Lys Gly Gln Glu His Lys Thr Val |      |     |     |
| 275   | 280  | 285 |     |
| cat tat gat gga agg aaa cgc agc agc aca gga gga gga gga gga gga | 912  |     |     |
| His Tyr Asp Gly Arg Lys Arg Ser Ser Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly |      |     |     |
| 290   | 295  | 300 |     |
| gga gga gga aca ctg tet gtg acc age ata cct cct gag cag gtg ctg | 960  |     |     |
| Gly Gly Gly Arg Leu Ser Val Thr Ser Ile Pro Pro Glu Gln Val Leu |      |     |     |
| 305   | 310  | 315 | 320 |
| ctc ctc ctt cag ggc gcc gag ccc ccc ata ctc tgc tgc cgt cag aag | 1008 |     |     |
| Leu Leu Leu Gln Gly Ala Glu Pro Pro Ile Leu Cys Ser Arg Gln Lys |      |     |     |
| 325   | 330  | 335 |     |
| Ulg age cga ccc tac acc gag gtc acc atg atg acc ctg ctc acc age | 1056 |     |     |
| Leu Ser Arg Pro Tyr Thr Glu Val Thr Met Met Thr Leu Leu Thr Ser |      |     |     |
| 340   | 345  | 350 |     |
| atg gca gac aag gag ctg gtc cac atg atc gcc tgg gcc aag aag ctc | 1104 |     |     |
| Met Ala Asp Lys Glu Leu Val His Met Ile Ala Trp Ala Lys Lys Leu |      |     |     |
| 355   | 360  | 365 |     |
| cca ggt ttt ctg cag ctg tcc ctg cac gat cag gtg ctg ctg ctg gag | 1152 |     |     |
| Pro Gly Phe Leu Gln Leu Ser Leu His Asp Gln Val Leu Leu Leu Glu |      |     |     |
| 370   | 375  | 380 |     |
| age tgc tgg ctg gag gtg ctc atg atc ggc ctc att tgg agg tcc atc | 1200 |     |     |
| Ser Ser Trp Leu Glu Val Leu Met Ile Gly Leu Ile Trp Arg Ser Ile |      |     |     |
| 385   | 390  | 395 | 400 |
| cac tgt ccc gag aag ctc atc ttt gca caa gac ctc atc ctg gac agg | 1248 |     |     |
| His Cys Pro Gly Lys Leu Ile Phe Ala Gln Asp Leu Ile Leu Asp Arg |      |     |     |
| 405   | 410  | 415 |     |
| aat gag gga gac tgc gtg gaa ggc atg acg gag atc ttc gac atg ctg | 1296 |     |     |
| Asn Glu Gly Asp Cys Val Glu Gly Met Thr Glu Ile Phe Asp Met Leu |      |     |     |
| 420   | 425  | 430 |     |
| ctg gcc act gct tcc cgc ttc cgt gtg ctc aaa ctc aaa cct gag gaa | 1344 |     |     |
| Leu Ala Thr Ala Ser Arg Phe Arg Val Leu Lys Leu Lys Pro Glu Glu |      |     |     |
| 435   | 440  | 445 |     |
| ttc gtc tgc ctc aaa gct att att tta ctc aac tcc ggt gct ttt tct | 1392 |     |     |
| Phe Val Cys Leu Lys Ala Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Ala Phe Ser |      |     |     |
| 450   | 455  | 460 |     |

|   |      |
|---|------|
| Utt tgc acc ggc acc atg gag cca ctt cae aac age gcg gcg gtt cag | 1110 |
| Phe Cys Thr Gly Thr Met Glu Pro Leu His Asn Ser Ala Ala Val Gln |      |
| 465 470 475 480   |      |
| age atg ctg gac acc alc aca gac gca ctc att cat tac atc agt cag | 1488 |
| Ser Met Leu Asp Thr Ile Thr Asp Ala Leu Ile His Tyr Ile Ser Gln |      |
| 485 490 495   |      |
| tcg ggt tac ttg gcc cag gag cag gcg aga egg cag gcc cag ccg ctc | 1536 |
| Ser Gly Tyr Leu Ala Gln Glu Gln Ala Arg Arg Glu Ala Gln Pro Leu |      |
| 500 505 510   |      |
| ctg ctg ctc tcc cae alc agg cae atg age aac aaa ggc atg gag cae | 1584 |
| Leu Leu Leu Ser His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His |      |
| 515 520 525   |      |
| ctc tac age atg aag tgc aag aac aaa gtc cct ctt tat gac ctc cta | 1632 |
| Leu Tyr Ser Met Lys Cys Lys Asn Lys Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu |      |
| 530 535 540   |      |
| ctg gag atg ctc gat gcc cae cgc ctg cae cae ccc gtc aga gcc ccc | 1680 |
| Leu Glu Met Leu Asp Ala His Arg Leu His His Pro Val Arg Ala Pro |      |
| 545 550 555 560   |      |
| cag tcc ttg tcc caa gtc gac aga gac cct ccc tcc acc age age ggc | 1728 |
| Gln Ser Leu Ser Gln Val Asp Arg Asp Pro Pro Ser Thr Ser Ser Gly |      |
| 565 570 575   |      |
| ggg ggt gga atc gct ccc ggt tct ata tca gca tct cga ggc aga atc | 1776 |
| Gly Gly Gly Ile Ala Pro Gly Ser Ile Ser Ala Ser Arg Gly Arg Ile |      |
| 580 585 590   |      |
| gag agt ccg age aga ggc ccc ttt gct ccc agt gtc ctt cag tat gga | 1824 |
| Glu Ser Pro Ser Arg Gly Pro Phe Ala Pro Ser Val Leu Gln Tyr Gly |      |
| 595 600 605   |      |
| ggg tcg cgt cct gac tgc acc cgg gcc ctt caa gac tga             | 1863 |
| Gly Ser Arg Pro Asp Cys Thr Pro Ala Leu Gln Asp                 |      |
| 610 615 620   |      |

## 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のエストロジェンレセプター遺伝子を発現させるための発現ベクターの構築過程を示す図である。

【図2】本発明のエストロジェンレセプター遺伝子を発現させるための発現ベクター-RSV-ERの構造を示す図である。pRC/RSVは構築に用いたベクターである。ERは本発明のエストロジェン遺伝子を、RSV LTRはRSVプロモーターを、pSV40はSV40プロモーターを、Neomycinはネオマイシン耐性遺伝子をそれぞれ示す。

【図3】エストロジェン応答配列とレポーター遺伝子とを含むレポータープラスミドERE-tK-pGL（図中ではERE-pGLと表示）の構築過程を示す図である。

【図4】エストロジェン応答配列とレポーター遺伝子とを含むレポータープラスミドERE-tK-pGLの構造を示す図である。EREはエストロジェン応答配列が4個連結された配列を意味し、tk promoterはTKプロモーターを、Amp<sup>r</sup>アンピシリン耐性遺伝子を示す。

【図5】レポーターアッセイ用の細胞を調製するためのトランスフェクションの条件を検討した結果を示す図で

ある。上段の図は、トランスフェクション試薬にリポフェクチンを使用した場合、下段の図はリポフェクトアミンを使用した場合の結果を示す。

【図6】レポーターアッセイ用の細胞を調製するためのトランスフェクションにおいて、添加するトランスフェクション試薬の量を検討した結果を示す図である。上段の図は、リポフェクチンを使用した場合、下段の図はリポフェクトアミンを使用した場合の結果を示す。

【図7】レポーターアッセイ用の細胞を調製するためのトランスフェクションにおいて、添加するプラスミドの量を検討した結果を示す図である。上段の図は、リポフェクチンを使用した場合、下段の図はリポフェクトアミンを使用した場合の結果を示す。

【図8】レポーターアッセイにおける $\beta$ -エストラジオールのエストロジェンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1ウェルあたり0.25 $\mu$ gのレセプター発現ベクター-RSV-ER、0.15 $\mu$ gのレポータープラスミドERE5-tK-pGL、および、0.1 $\mu$ gのコントロールレポータープラスミドpGL-tKを導入した細胞を試験に用いた。上段の図は、トランスフェクション試薬にリポフェクチン

ンを使用した場合、下段の図はリポフェクタミンを使用した場合の結果を示す。

【図9】レポーターアッセイにおける $\beta$ -エストラジオールのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1ウェルあたり0.25 $\mu$ gのレセプター発現ベクター-RSV-ER、0.15 $\mu$ gのレポータープラスミドERE5-tk-pGL、および、0.1 $\mu$ gのコントロールレポータープラスミドpRL-tkをリポフェクタミンを用いて導入した細胞を試験に用いた。

【図10】レポーターアッセイにおけるビスフェノールAのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1ウェルあたり0.25 $\mu$ gのレセプター発現ベクター-RSV-ER、0.15 $\mu$ gのレポータープラスミドERE5-tk-pGL、および、0.1 $\mu$ gのコントロールレポータープラスミドpRL-tkをリポフェクタミンを用いて導入した細胞を試験に用いた。E2は、終濃度500pMの $\beta$ -エストラジオールが添加された系を示す。

【図11】レポーターアッセイにおけるp-ノニルフェノールのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1ウェルあたり0.25 $\mu$ gのレセプター発現ベクター-RSV-ER、0.15 $\mu$ gのレポータープラスミドERE5-tk-pGL、および、0.1 $\mu$ gのコントロールレポータープラスミドpRL-tkをリポフェクタミンを用いて導入した細胞を試験に用いた。E2は、終濃度500pMの $\beta$ -エストラジオールが添加された系を示す。

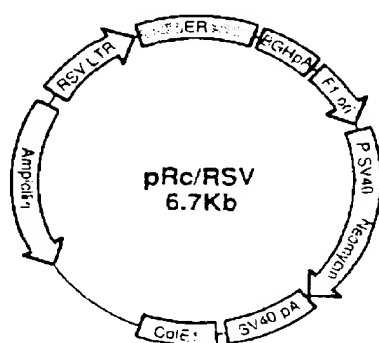
【図12】レポーターアッセイにおける酢酸トリブチルすずのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1ウェルあたり0.25 $\mu$ gのレセプター発現ベクター-RSV-ER、0.15 $\mu$ gのレポータープラスミドERE5-tk-pGL、および、0.1 $\mu$ gのコントロールレポ-

タープラスミドpRL-tkをリポフェクタミンを用いて導入した細胞を試験に用いた。E2は、終濃度500pMの $\beta$ -エストラジオールが添加された系を示す。

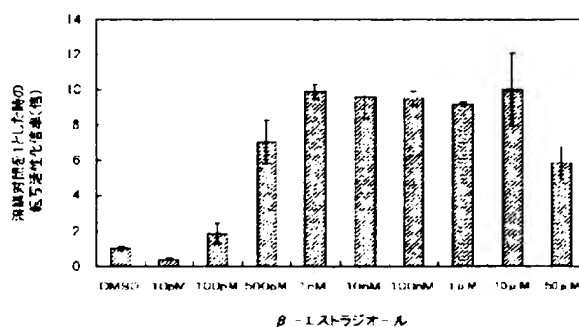
【図13】レポーターアッセイにおけるフタル酸ジ-2-エチルヘキシルのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1ウェルあたり0.25 $\mu$ gのレセプター発現ベクター-RSV-ER、0.15 $\mu$ gのレポータープラスミドERE5-tk-pGL、および、0.1 $\mu$ gのコントロールレポータープラスミドpRL-tkをリポフェクタミンを用いて導入した細胞を試験に用いた。E2は、終濃度500pMの $\beta$ -エストラジオールが添加された系を示す。

【図14】レポーターアッセイにおける各種化合物のエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1ウェルあたり0.25 $\mu$ gのレセプター発現ベクター-RSV-ER、0.15 $\mu$ gのレポータープラスミドERE5-tk-pGL、および、0.1 $\mu$ gのコントロールレポータープラスミドpRL-tkをリポフェクタミンを用いて導入した細胞を試験に用いた。E2は終濃度500pMの $\beta$ -エストラジオールが添加された系を、Tisは終濃度50 $\mu$ Mの酢酸トリブチルすずが添加された系を、BisAは終濃度50 $\mu$ MのビスフェノールAが添加された系を、Di-2は終濃度50 $\mu$ Mのフタル酸ジ-2-エチルヘキシルが添加された系を、Noは終濃度50 $\mu$ Mのノニルフェノールが添加された系を示す。顕微鏡観察により判定された死亡細胞率は、酢酸トリブチルすずが添加された系において90%以上、ビスフェノールAが添加された系において0%、フタル酸ジ-2-エチルヘキシルが添加された系において90%以上、ノニルフェノールが添加された系において40%前後であった。

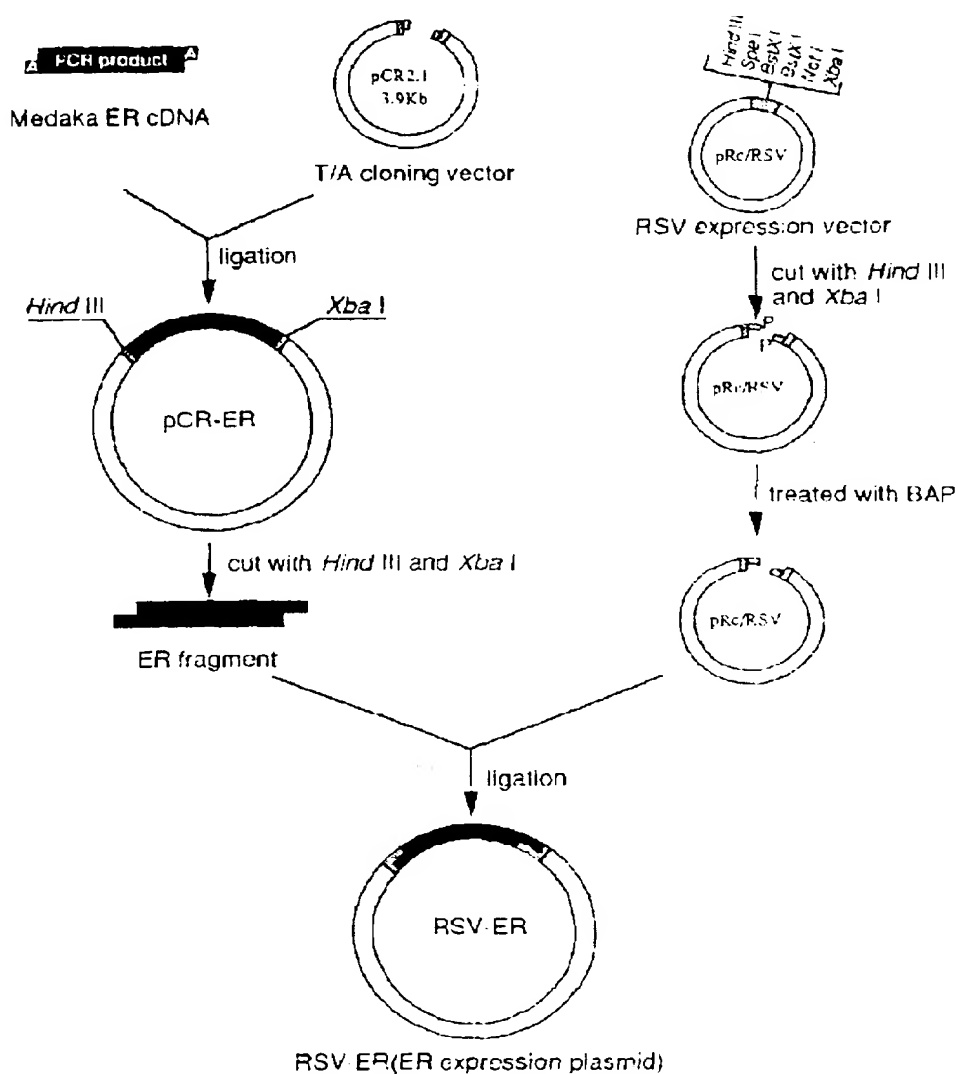
【図2】



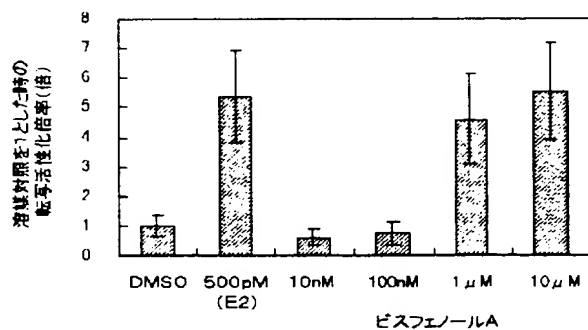
【図9】



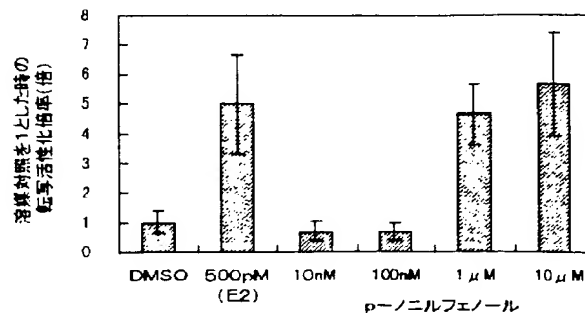
【図1】



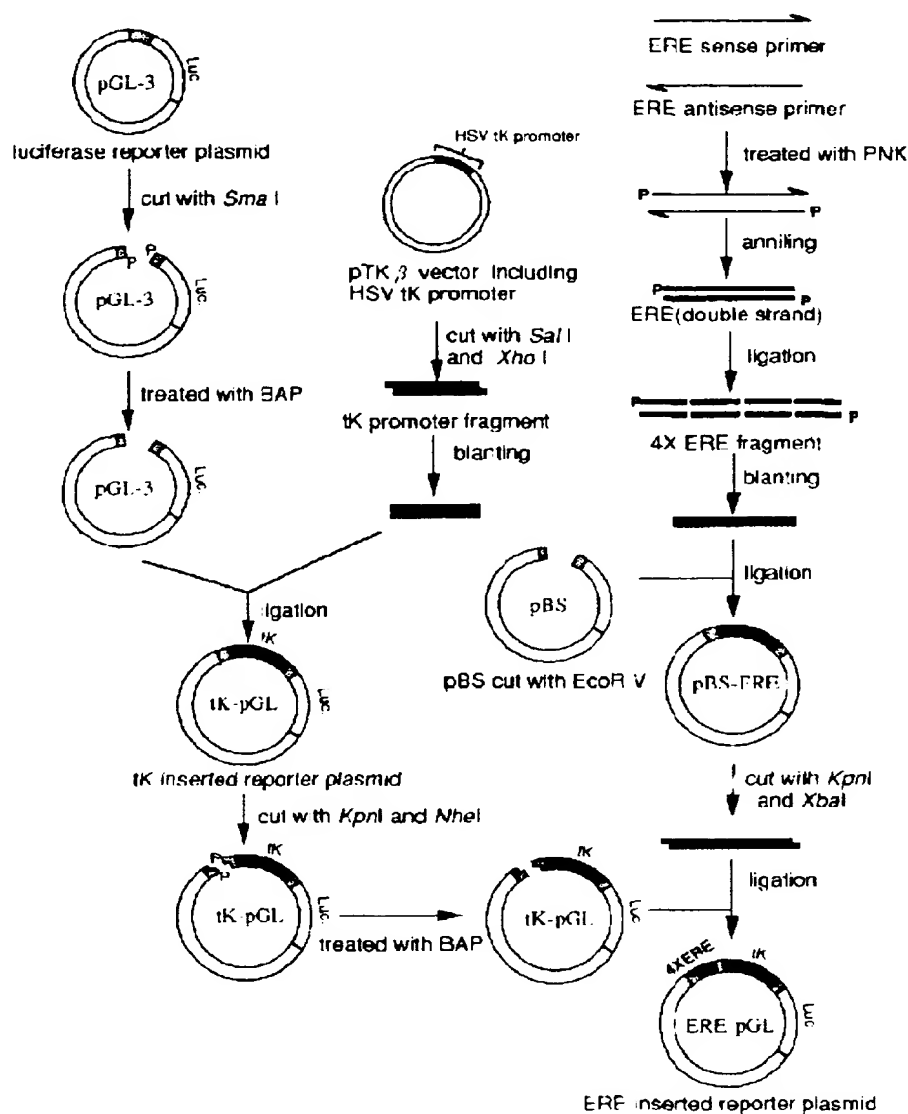
【図10】



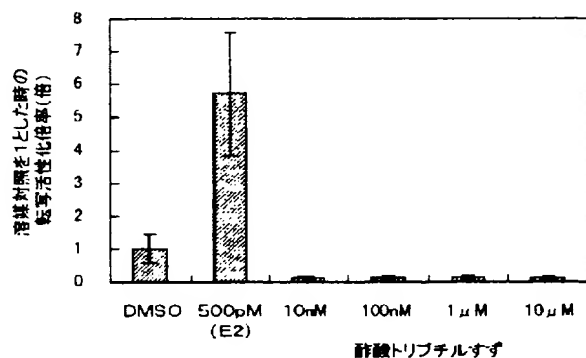
【図11】



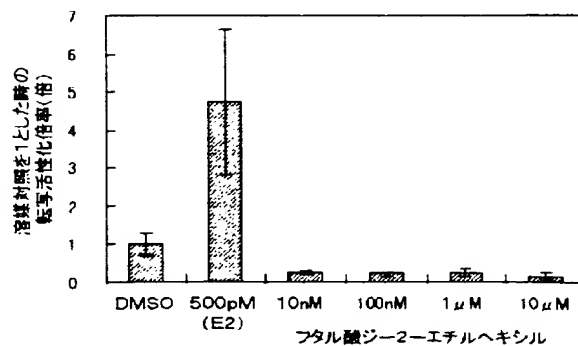
【図3】



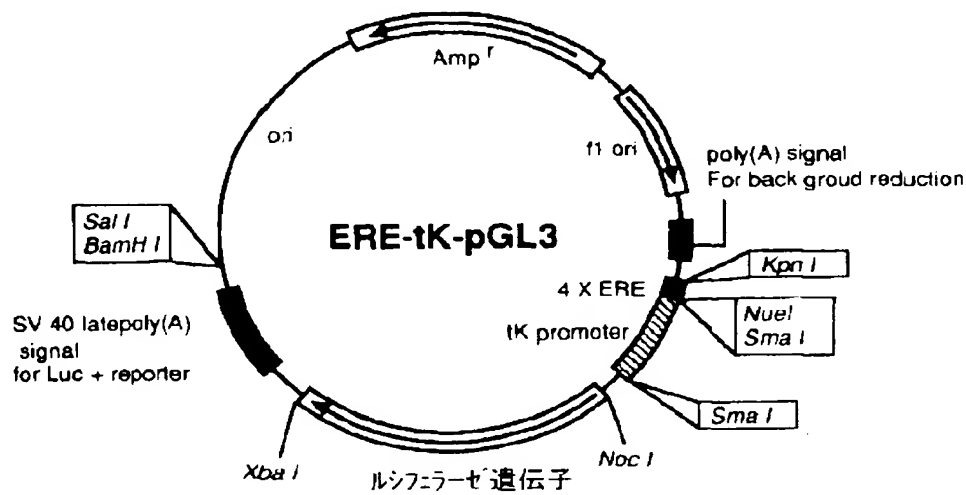
【図12】



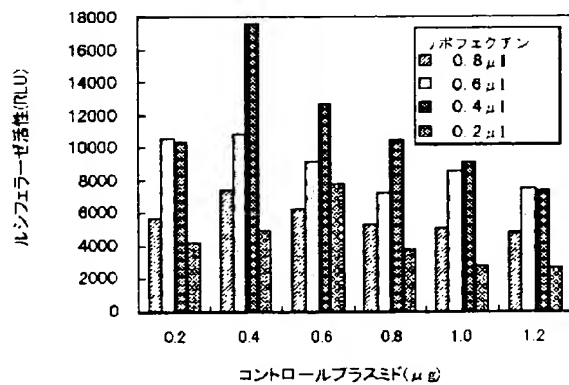
【図13】



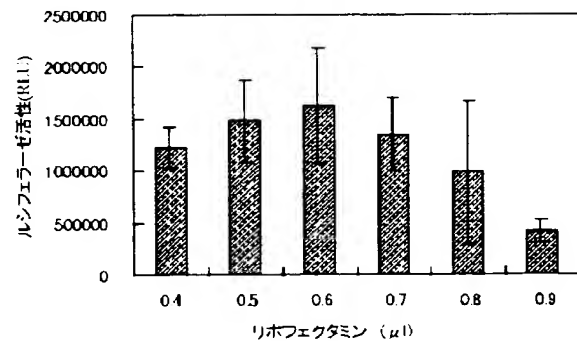
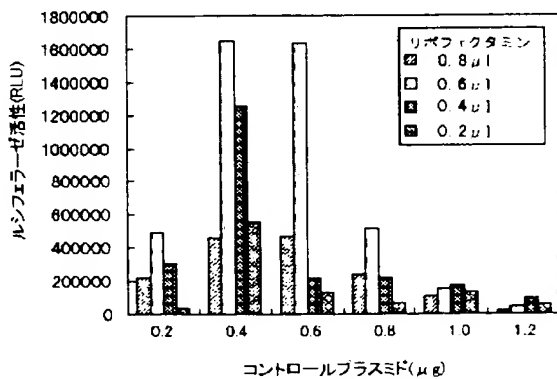
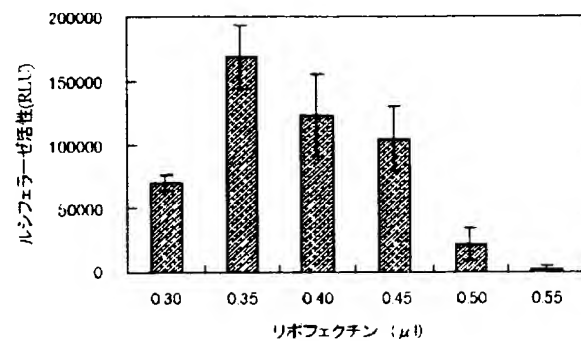
【図4】



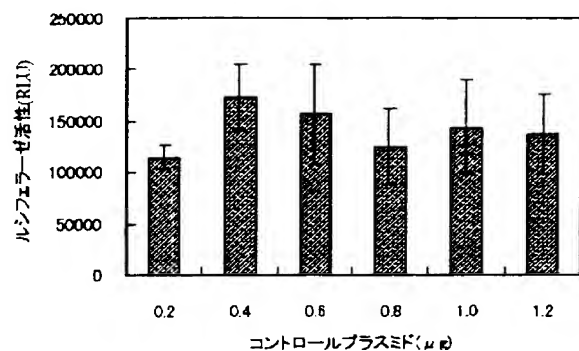
【図5】



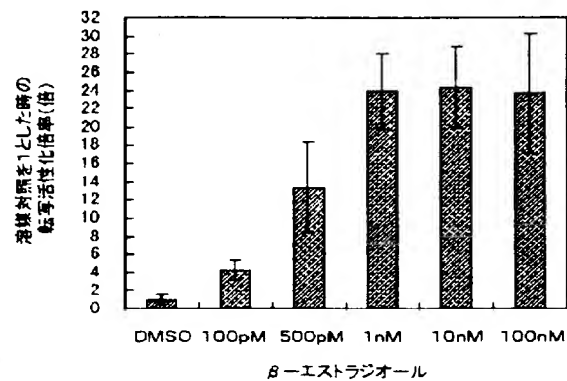
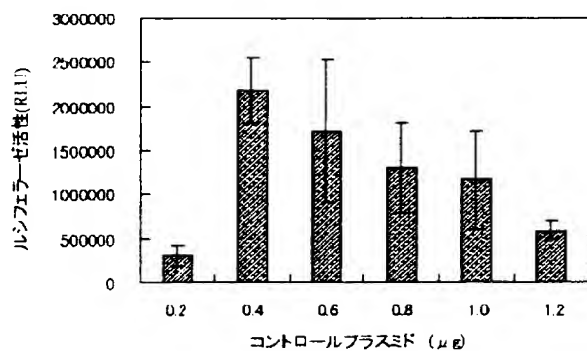
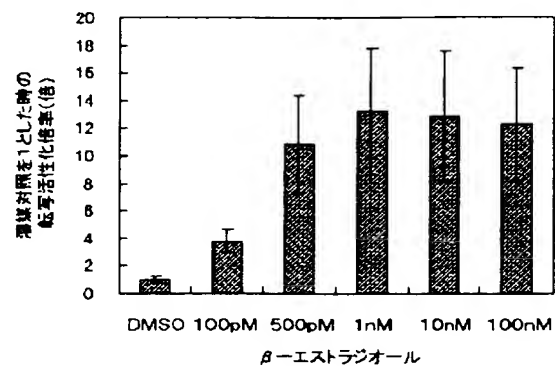
【図6】



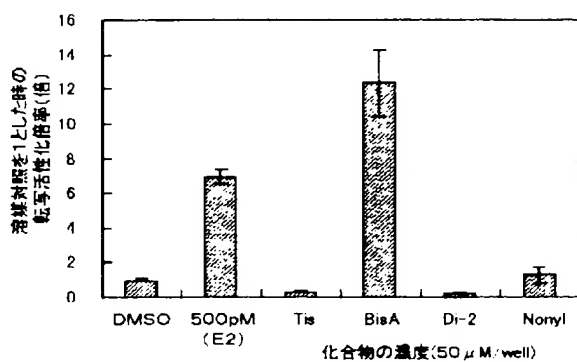
【図7】



【図8】



【図14】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>  
 A61K 31/20 15/09  
 C12R 1/91  
 (C12P 21/02  
 C12R 1/91)

識別記号  
 ZNA

F I

テマコード (参考)

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA17 AA20 BA03 DA02  
EA04 FA02 FA10 GA13 HA03  
HA11  
4B063 QA01 QQ22 QQ61 QQ75 QQ91  
QQ94 QR33 QR60 QR77 QR80  
QS36 QX02  
4B064 AG20 CA10 CA19 CC24 DA13  
DA16  
4B065 AA90Y AA93X AB01 AC14  
BA05 CA46  
4B045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA52  
DA50 EA50 FA72 FA74 HA06